

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>6</sup>:C12N 15/29, A01H 5/00, C07H 3/06,  
C07K 14/415, A61K 39/36

A2

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/49045

(43) Internationales  
Veröffentlichungsdatum:

30. September 1999 (30.09.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT99/00081

(22) Internationales Anmeldedatum: 25. März 1999 (25.03.99)

(30) Prioritätsdaten:

A 539/98

26. März 1998 (26.03.98)

AT

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOMAY  
PRODUKTIONS- UND HANDELSGESELLSCHAFT  
MBH [AT/AT]; Herrenstrasse 2, A-4020 Linz (AT).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FERREIRA, Fatima  
[BR/AT]; Würzenberg 35, A-5102 Anthering (AT).  
RICHTER, Klaus [AT/AT]; Auwaldstrasse 218, A-5081  
Anif (AT). ENGEL, Edwin [AT/AT]; Karl im Hof Weg  
6, A-8773 Kamnern (AT). EBNER, Christof [AT/AT];  
Heinrich-Albrechtgasse 19/1, A-2345 Brunn am Gebirge  
(AT). KRAFT, Dietrich [AT/AT]; Montigasse 1, A-1170  
Wien (AT). BREITENBACH, Michael [AT/AT]; Leder-  
waschgasse 22/4, A-5020 Salzburg (AT). HIMLY, Martin  
[AT/AT]; Anzengruberstrasse 7, A-9500 Villach (AT).(74) Anwälte: CASATI, Wilhelm usw.; Amerlingstrasse 8, A-1061  
Wien (AT).(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,  
BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB,  
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,  
KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW,  
ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG,  
ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,  
TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI  
Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR,  
NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: RECOMBINANT MAJOR ALLERGEN OF THE POLLEN OF ARTEMISIA VULGARIS (MUGWORT)

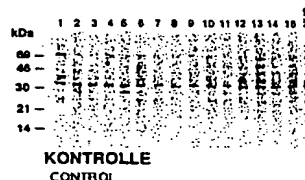
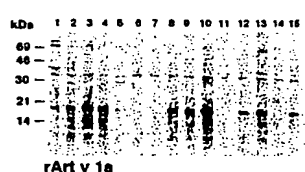
(54) Bezeichnung: REKOMBINANTES HAUPTALLERGEN DES POLLENS VON ARTEMISIA VULGARIS (BEIFUSS)

(57) Abstract

The invention relates to DNA molecules which code for the allergen Art v 1 or isoforms thereof, the sequence of the allergen, a method for the production of an Art v 1 molecule, a vector and a transformed host cell.

(57) Zusammenfassung

Gezeigt werden rekombinante DNA-Moleküle, die für das Allergen Art v 1 bzw. die zugehörigen Isoformen codieren, die Sequenz des Allergens, ein Verfahren zur Herstellung eines Art v 1 Moleküles, sowie ein Vektor und eine transformierte Wirtszelle.



IgE Immunoblot von rekombinanten Art v 1a (rArt v 1a). Seren von 15  
Beifußpollen-allergischen Patienten (1-15) wurden auf ihre IgE-  
Bindungseigenschaften mit Beifußpollenextrakt und mit rArt v 1a getestet,  
welches in *E. coli* BL21 exprimiert worden war. Als Kontrolle wurde bakterielles  
Lysat von *E. coli* verwendet, welches den Expressionsvektor pMW172 ohne  
Insert enthält. NHS: Normales Humanserum.

IgE RECOMBINANT-TYPE IMMUNE BLOT v 1a (rArt v 1a). SERINES FROM 15 PATIENTS  
(1-15) ALLERGIC TO MUGWORT POLLEN WERE TESTED FOR THEIR IgE BONDING  
PROPERTIES WITH MUGWORT POLLEN EXTRACT AND rArt v 1a WHICH WAS EXPRESSED  
IN *E. coli* BL21. *E. coli* BACTERIAL LYSATE WAS USED AS A CONTROL, CONTAINING  
THE pMW172 EXPRESSION VECTOR WITHOUT AN INSERT. NHS: NORMAL HUMAN SERUM.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidsschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Rekombinantes Hauptallergen des Pollens von *Artemisia vulgaris* (Beifuß)

Die Erfindung bezieht sich auf rekombinante DNA-Moleküle, die für das Allergen Art v 1a codieren, auf ein Verfahren zur Herstellung eines Art v 1 Moleküles, sowie auf einen Vektor und eine transformierten Wirtszelle.

Beifußpollen ist einer der wichtigsten Verursacher von Allergien in Europa im Spätsommer (1,2). Unter allen jenen Patienten, die an Pollenallergie leiden, ist die Häufigkeit der durch Beifußpollen ausgelösten allergischen Erkrankungen etwa 10-14% (2,3). Immunblots des Gesamtproteins aus dem Extrakt von Beifußpollen zeigen, daß die IgEs der Patienten ein Hauptallergen vom Molekulargewicht 27-29 kDa erkennen, welches daher Art v 1 genannt wurde. Über 95% aller Patienten, die gegen Beifußpollen allergisch sind, erkennen Art v 1 im IgE-Immunblot. Solche Immunblots werden nachfolgend "Patientenblots" genannt. Einige andere Proteine des Beifußpollens wandern in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ebenfalls mit einem scheinbaren Molgewicht von 27-29 kDa. Es war daher schwierig einen cDNA-Klon zu isolieren und zu beweisen, daß er für Art v 1 codiert.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein rekombinantes DNA-Molekül zu schaffen, das für das Allergen des Pollens von *Artemisia vulgaris* codiert.

Erfindungsgemäß wird dies dadurch erreicht, daß ein DNA-Molekül rekombinant geschaffen ist, welches für das Allergen Art v 1a codiert, welches die in SEQ ID Nr. 2 gezeigte Sequenz besitzt. Damit ist das Hauptallergen von *Artemisia vulgaris* aufgefunden und einer Diagnose bzw. Therapie zugänglich gemacht. Diese DNA-Moleküle sind durch die Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr.1 gekennzeichnet. Diese Moleküle können aber auch eine durch Degeneration des genetischen Codes aus der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NR. 2 abgeleitet sein. Bevorzugt können die erfindungsgemäßen Moleküle mehr als 60 % Sequenzidentität mit SEQ ID Nr. 1 aufweisen. Weiters kann das erfindungsgemäße rekombinante DNA-Molekül für die in SEQ ID Nr. 4 und 6 gezeigten Aminosäuresequenzen der Isoformen Art v 1b und Art v 1c codieren. Dabei können diese rekombinanten DNA-Moleküle die in SEQ ID Nr. 3 und 5 gezeigten Nukleotidsequenzen aufweisen. Die erfindungsgemäßen rekombinanten DNA-Moleküle können mit der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten Sequenz hybridisieren und unter stringenten Waschbedingungen durch Hybridisierung gebunden bleiben.

Gleiches gilt auch hinsichtlich der in SEQ ID Nr. 3 und 5 gezeigten Sequenzen. Als stringente Hybridisierungsbedingungen sind z. B. 1 M NaCl in H<sub>2</sub>O bei 60°C und als stringente Waschbedingungen sind z. B. 2 Mal für 30 min. waschen bei 50°C in 5x SSPE und

0,1 % SDS anzusehen (1x SSPE ist 0,18 M NaCl 0,01 M Natriumphosphat pH 7,4, 1m M EDTA).

Ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Herstellung eines Art v1 Allergens ist durch die folgenden Schritte gekennzeichnet:

5 a) Züchten prokaryotischer oder eukaryotischer Wirtszellen, die eine für Art v 1 codierende DNA (SEQ ID Nr. 1) bzw. eine mit dieser Sequenz 60 %ige Sequenzidentität aufweisende DNA enthalten, so daß das Art v 1 Allergen durch die Wirtszellen exprimiert wird;

b) Isolierung des Allergens Art v 1.

10 Dieses rekombinante Allergen kann glycosyliert sein. Für das Verfahren kann ein replikationsfähiger prokaryotischer oder eukaryotischer Expressionssektor vorgesehen sein, der die unter Schritt a) des Verfahrens angeführten DNA-Moleküle enthält. Ein solcher Expressionssektor ist in den genannten Wirtszellen enthalten, welche bevorzugt *Escherichia coli* oder *Pichia pastoris* sein können.

15 Es wird also die Isolierung eines authentischen und vollständigen cDNA-Klons gezeigt, der für Art v 1a (Fig. 1), das Hauptallergen des Beifußpollens codiert. Der Buchstabe a in Art v 1a bezeichnet die Isoform a. Dazu wurden zwei weitere Klone isoliert, die ebenfalls für authentische und vollständige Isoformen von Art v 1 codieren, die Art v 1b und Art v 1c genannt wurden. Die Sequenzen der beiden letztgenannten Isoformen werden in Fig. 2 und  
20 Fig. 3 gezeigt. Die Klone sind am 5'-Ende vollständig, was daraus ersichtlich ist, daß sie ein AUG Startcodon in einem typisch eukaryotischen Kontext beinhalten. Die Klone sind aber auch am 3'-Ende vollständig, da sie nach dem Stopcodon 177-200 Nukleotide gefolgt von einer polyA-Sequenz enthalten. Die außerhalb der offenen Leserahmen liegenden Sequenzen der Klone werden in den Abbildungen nicht gezeigt. Die beiden Fig. 4 und 5 zeigen  
25 "alignments" der Nukleotidsequenzen und der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von Art v 1a, b und c. Diese Vergleiche zeigen, daß Art v 1 eine Mischung verschiedener Isoformen ist, die untereinander verhältnismäßig große Abweichungen sowohl der Nukleotid- als auch der Aminosäuresequenz zeigen. Diese Sequenzabweichungen sind in den nichttranslatierten Bereichen der cDNA-Sequenzen größer als innerhalb der offenen Leserahmen (Daten nicht  
30 gezeigt). Sehr wahrscheinlich werden die Isoformen von Art v 1 von einer Genfamilie codiert. Diese Genfamilie ist allerdings nicht spezifisch für die Art oder Gattung von *Artemisia*

vulgaris, da eine homologe cDNA-Sequenz auch in der Sonnenblume gefunden wurde (4). Dieses Protein der Sonnenblume (SF18) wird in den Epidermiszellen der Antheren synthetisiert und könnte eine Pollen-spezifische Funktion haben. Es zeigt Ähnlichkeit zur Familie der Gamma-Purothionine.

5

### BEISPIEL:

Die Isolierung des für Art v 1a codierenden Klons wurde in folgender Weise durchgeführt:

10 Es wurde eine cDNA Expressionsbank in dem Phagen Lambda-ZAP II (Stratagene, La Jolla, California; Katalog-Nr.237612) hergestellt. Das Ausgangsmaterial war die aus Beifußpollen isolierte mRNA. Diese cDNA-Bank wurde mit einem Serumgemisch gescreent, das aus 20 Seren von Patienten bestand, welche im Patientenblot Art v 1 erkennen. Ein Klon, welcher positiv mit dem Serumgemisch reagierte, wurde weiter untersucht und ergab  
15 schließlich 100% immunopositive Plaques. Die Immunreaktion dieses Klons war relativ schwach, aber eindeutig positiv. Der Beweis, daß dieser Klon für Art v 1 codiert, wurde wie folgt geführt:

Das Hauptallergen Art v 1 wurde unter sehr milden Bedingungen, nämlich Raumtemperatur, Extraktion mit Wasser für 15-30 min. unter leichtem Schütteln, aus  
20 Beifußpollen extrahiert. Dieser Extrakt wurde durch präparative Gelelektrophorese weiter aufgetrennt und die Fraktionen wurden im Immunblot getestet. Fig. 6a zeigt drei Fraktionen (F1, F2 und F3), die nach der Färbung mit Coomassie Brilliant Blue frei von Proteinverunreinigungen waren und Proteinbanden mit einem scheinbaren Molekulargewicht zwischen 22 und 29 kDa zeigten. Gelegentlich war auch eine Dimerenbande bei 50 kDa  
25 erkennbar. Fig. 6b zeigt die Patientenblots dieser Fraktionen. Es ist klar, daß die Fraktion mit dem höchsten Molekulargewicht Seren von allen 3 hier getesteten Patienten bindet, während die Fraktion mit dem geringsten Molekulargewicht von den Patientenseren nur schwach erkannt wird. Fig. 6c zeigt die selben Proteinblots nach Färbung mit dem "glycoprotein detection kit" (DIG glycan/protein double labeling kit, Katalog Nr. 1500783) von Boehringer  
30 Mannheim. Es zeigt sich klar, daß alle drei Fraktionen aus Glycoprotein bestehen. Alle drei Fraktionen wurden durch N-terminalen Edman Abbau charakterisiert und ergaben identische

N-terminale Sequenzen, welche in den Fig. 1- 3 unterstrichen sind. Die Computeranalyse der abgeleiteten Proteinsequenz in Fig. 1 nach Nielsen et al. (5) sagt vorher, daß Art v 1 eine typische N-terminale hydrophobe Signalsequenz enthält, die zum "targeting" ins endoplasmatische Retikulum und in den Golgiapparat führt. Die Sequenz nach dem Beginn  
5 der durch die Computeranalyse vorhergesagten reifen Proteinsequenz ist identisch mit der im natürlichen Protein gefunden N-terminalen Sequenz (unterstrichen in den Fig. 1-3). Eine ganz ähnliche N-terminale partielle Sequenz wurde von Matthiesen et al. (6) gefunden. Es kann daher daraus geschlossen werden, daß Art v 1 ein sezerniertes Glycoprotein ist, dessen N-terminus durch die Abspaltung einer typischen ER Signalsequenz entsteht. Das natürliche  
10 Protein ist durch Unterschiede im Glycosilierungsgrad heterogen, und die voll glycosilierte Form (F3 in Fig. 6) bindet IgE am besten.

Der erste auf diese Weise isolierte cDNA-Klon von Art v 1 wurde nun mit Phosphor 32 markiert und als Hybridisierungsprobe benützt. Die oben erwähnte cDNA-Klonbank wurde mit dieser Hybridisierungsprobe gescreent und zwei weitere Klone, Art v 1b und Art v 1c,  
15 wurden gefunden. Diese Klone wurden durch sequenzieren der DNA weiter analysiert. Die Sequenzen werden in den Figs. 2 und 3 gezeigt.

Es wurde E. coli benutzt, um die reife (kurze) Form von Art v 1a als rekombinantes Nichtfusionsprotein zu exprimieren. Dazu wurde der entsprechende Teil der cDNA in das Expressionssystem pMW172 cloniert. Es ist wohl bekannt, daß in E. coli exprimierte  
20 rekombinante Proteine keine postsynthetischen Modifikationen aufweisen, mit der möglichen Ausnahme der Abspaltung des N-terminalen Methionins. Solche rekombinanten Proteine enthalten keine Zuckermoleküle. Die Konstruktion des Expressionsplasmids wird in Fig. 7 gezeigt. Das rekombinante Protein Art v 1 reicherte sich in der löslichen Fraktion der E. coli Proteine an. Fig. 8 zeigt Patientenblots der löslichen Fraktion mit 15 Patienten. Das scheinbare  
25 Molekulargewicht des natürlichen Proteins beträgt etwa 27 kDa (Fig. 8 Beifußpollen), während das scheinbare Molekulargewicht des rekombinanten Proteins wegen der Abwesenheit der Zucker nur 18 kDa beträgt. Das theoretische Molekulargewicht wäre 10,8 kDa, was darauf hinweist, daß das rekombinante Protein eine sehr ungewöhnliche elektrophoretische Mobilität in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigt. Fig. 8 (rArt v  
30 1a) zeigt sehr deutlich, daß 10 der 15 Patienten im Patientenblot das unglycosilierte Protein erkennen. Es existieren aber auch Patienten, die diese Form des Proteins nicht erkennen.

Überraschenderweise erkennen die Patienten 3, 4 und 10 die unglycosilierte Form besser als die natürliche glycosilierte Form. Die Kontrollen in Fig. 8 zeigen das E. coli Proteine von den Patienten und von den sekundären Antikörpern nicht oder nur ganz schwach erkannt werden. Diese sehr schwachen Banden zeigen sich gleichmäßig in allen drei in Fig. 8 gezeigten Patientenblots.

Um die im letzten Absatz vorgestellten experimentellen Ergebnisse zu erklären, wird folgende Hypothese aufgestellt: Es könnte sein, daß die Zuckeranteile von Art v 1 notwendig sind, um das Proteinrückgrat in seine natürliche Konformation zu bringen, so daß die IgE einiger Patienten an diese so entstandenen Epitope binden können. Einige andere Epitope sind hingegen in Abwesenheit der Zucker gut für die Patientenserum erkennbar. Eine andere aber weniger wahrscheinliche Erklärung für diese Beobachtungen besteht in der Möglichkeit, daß die Serum jener Patienten, die die unglycosilierte Form nicht erkennen, tatsächlich direkt gegen Epitope gerichtet sind, die aus den Zuckermolekülen bestehen.

#### 15 Vorläufige Charakterisierung des Zuckeranteils des natürlichen Hauptallergens von *Artemisia vulgaris*, Art v 1.

Natürliches Hauptallergen von *Artemisia vulgaris* wurde zur Homogenität gereinigt durch:

- 20 1. Anionenaustauschchromatographie an Sepharose Q (Pharmacia, Uppsala, Schweden) bei pH=5.2 und
2. HPLC-Gelfiltrationschromatographie an TSK-Gel G2000SW (Tosohaas, Stuttgart, BRD).

Das Material war homogen hinsichtlich seiner N-terminalen Proteinsequenz und  
25 Aminosäurezusammensetzung, jedoch heterogen hinsichtlich des Molekulargewichtes durch unterschiedliche Glykosylierung. Die Bestimmung des Molekulargewichtes erfolgte durch MALDI-TOF Massenspektrometrie und ergab zwei breite Peaks mit den mittleren Molekülmassen 13.5 kD und 15.5 kD. Das durch SDS-PAGE ermittelte scheinbare Molekulargewicht war jedoch 24 - 28 kD, was auf eine sehr ungewöhnliche Proteinstruktur  
30 oder ungewöhnliche Struktur des Glykoanteils hinweist. Die vorläufige Analyse der kovalent am Protein gebundenen Zucker durch Hydrolyse und HPLC ergab, daß keine N-

Glykosylierung und sehr wahrscheinlich auch keine typische O-Glykosylierung vorliegt, sondern wahrscheinlich eine bei pflanzlichen Glykoproteinen schon früher beschriebene Glykosylierung an Hydroxyprolin. Das sehr prolinreiche Protein, Art v 1 (20% Prolin) ist postsynthetisch modifiziert, so daß im reifen Protein Prolin und Hydroxyprolin im Verhältnis 4:6 vorliegen. Ausgedehnte Studien mit fünf verschiedenen Lektinen (Galanthus nivalis Agglutinin, Sambucus nigra Agglutinin, Maackia amurensis Agglutinin, Peanut Agglutinin und Datura stramonium Agglutinin), die für bekannte Zuckerstrukturen der N-Glykosylierung und O-Glykosylierung spezifisch sind, zeigten, daß diese Strukturen in Art v 1 nicht vorhanden sind. Die Rolle dieser ungewöhnlichen Proteinstruktur und der Struktur des Glykoanteils für die Ausbildung der B-Zell-Epitope dieses Allergens wird zur Zeit intensiv untersucht. Fig. 8 gibt einen ersten Eindruck davon, daß bei diesem Allergen die Glykoanteile eine wichtige Rolle für die IgE-Bindung spielen könnten.

15

## SEQUENZPROTOKOLLE:

(iii) ZAHL DER SEQUENZEN: 6

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 399 Basenpaare

25

(B) ART: Nukleotidsequenz

(C) STRANGFORM: Doppelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: c-DNA zu m-RNA

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

30

(iv) ANTISENSE: Nein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:



(A) ORGANISMUS: *Artemisia vulgaris*

(D) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

5 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1:

```
ATGGCAAAGT GTTCATATGT TTTCTGTGCG GTTCTTCTGA TTTTCATAGT TGCTATCGGA      60
10 GAAATGGAGG CCGCTGGTTC AAAGTTGTGT GAAAAGACAA GCAAGACGTA TTCGGGTAAG      120
   TGC GACAACA AGAAATGTGA CAAAAAGTGT ATAGAGTGGG AGAAAGCGCA ACATGGTGCT      180
   TGT CACAAGA GAGAAGCCGG CAAAGAAAGT TGCTTTTGCT ACTTTGACTG TTCCAAATCG      240
15 CCTCCTGGAG CAACACCAGC GCCTCCTGGT GCAGCTCCTC CCCCAGCTGC TGGCGGCTCT      300
   CCGTCACCTC CCGCTGATGG TGGCTCACCA CCTCCTCCAG CTGATGGTGG ATCTCCTCCT      360
20 GTAGATGGTG GCTCTCCACC TCCTCCGTCC ACTCACTAA      399
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:2:

25 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 132 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: unbekannt

30 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(iv) ANTISENSE: Nein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Artemisia vulgaris*

(D)

ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:2:

5

Met	Ala	Lys	Cys	Ser	Tyr	Val	Phe	Cys	Ala	Val	Leu	Leu	Ile	Phe	
1				5					10					15	
Ile	Val	Ala	Ile	Gly	Glu	Met	Glu	Ala	Ala	Gly	Ser	Lys	Leu	Cys	
				20					25					30	
10	Glu	Lys	Thr	Ser	Lys	Thr	Tyr	Ser	Gly	Lys	Cys	Asp	Asn	Lys	Lys
				35					40					45	
Cys	Asp	Lys	Lys	Cys	Ile	Glu	Trp	Glu	Lys	Ala	Gln	His	Gly	Ala	
				50					55					60	
Cys	His	Lys	Arg	Glu	Ala	Gly	Lys	Glu	Ser	Cys	Phe	Cys	Tyr	Phe	
15				65					70					75	
Asp	Cys	Ser	Lys	Ser	Pro	Pro	Gly	Ala	Thr	Pro	Ala	Pro	Pro	Gly	
				80					85					90	
Ala	Ala	Pro	Pro	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ser	Pro	Ser	Pro	Pro	Ala	
				95					100					105	
20	Asp	Gly	Gly	Ser	Pro	Pro	Pro	Pro	Ala	Asp	Gly	Gly	Ser	Pro	Pro
				110					115					120	
Val	Asp	Gly	Gly	Ser	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	Thr	His				
				125					130						

25

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:3:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 399 Basenpaare

30

(B) ART: Nukleotidsequenz

(C) STRANGFORM: Doppelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: c-DNA zu m-RNA

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

35

(iv) ANTISENSE: Nein

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT::

(A) ORGANISMUS: *Artemisia vulgaris*

(D) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

5

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:3:

10 ATGGCGAGGT GTTCATATGT TTTCTGCGCG GTTCTTCTGA TTTTCGTACT TGCTATCGGA 60

GAAATTGAGG CCGCTGGTTC AAAGCTGTGT GAAAAGACAA GCAAGACGTA TTCGGGTAAG 120

TGCGACAACA AGAAATGTGA CAAAAAGTGT ATAGAATGGG AGAAAGCACA ACATGGTGCT 180

15 TGTCACAAGA GAGAAGCCGG TAAAGAAAGT TGCTTTTGCT ACTTTGACTG TTCCAAATCG 240

CCTCCTGGAG CGACACCAGC GCCTCCTGGA GCATCTCCTC CCCCAGCTGC TGGCGGCTCT 300

20 CCACCACCTC CCGCCGATGG TGGCTCACCA CCTCCTCCAG CTGATGGTGG ATCTCCTCCT 360

GCCGATGGTG GCTCTCCACC TCCTCCGTCC GCTCACTAA 399

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:4:

25

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 132 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFROM: Einzelstrang

30

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(iv) ANTISENSE: Nein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Artemisia vulgaris*

(D) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:4:

	Met	Ala	Arg	Cys	Ser	Tyr	Val	Phe	Cys	Ala	Val	Leu	Leu	Ile	Phe
	1				5					10					15
10	Val	Leu	Ala	Ile	Gly	Glu	Ile	Glu	Ala	Ala	Gly	Ser	Lys	Leu	Cys
					20					25					30
	Glu	Lys	Thr	Ser	Lys	Thr	Tyr	Ser	Gly	Lys	Cys	Asp	Asn	Lys	Lys
					35					40					45
	Cys	Asp	Lys	Lys	Cys	Ile	Glu	Trp	Glu	Lys	Ala	Gln	His	Gly	Ala
15					50					55					60
	Cys	His	Lys	Arg	Glu	Ala	Gly	Lys	Glu	Ser	Cys	Phe	Cys	Tyr	Phe
					65					70					75
	Asp	Cys	Ser	Lys	Ser	Pro	Pro	Gly	Ala	Thr	Pro	Ala	Pro	Pro	Gly
					80					85					90
20	Ala	Ser	Pro	Pro	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ser	Pro	Pro	Pro	Pro	Ala
					95					100					105
	Asp	Gly	Gly	Ser	Pro	Pro	Pro	Pro	Ala	Asp	Gly	Gly	Ser	Pro	Pro
					110					115					120
	Ala	Asp	Gly	Gly	Ser	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	Ala	His			
25					125					130					

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:5:

30

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 399 Basenpaare

(B) ART: Nukleotidsequenz

(C) STRANGFORM: Doppelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

35

(ii) ART DES MOLEKÜLS: c-DNA zu m-RNA

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(iv) ANTISENSE: Nein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Artemisia vulgaris*

(D) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:5:

10 ATGGCAAAGT GTTCATATGT TTTCTGTGCG GTTCTTCTGA TTTTCATACT TGCTATCGGA 60  
GAAATAGAGG CCGCTGGTTC AAAGCTGTGT GAAAAGACAA GCAAGACGTA TTCAGGTAAG 120  
15 TGCGACAACA AGAAATGTGA CAAAAGTGT ATAGAATGGG AGAAAGCACA ACATGGTGCT 180  
TGTCACAAGA GAGAAGCCGG TAAAGAAAGT TGCTTTTGCT ACTTTGACTG TTCCAAATCG 240  
CCTCCTGGAG CGACACCAGC GCCTCCTGGA GCATCTCCTC CCCCAGCTGC TGGCGGCTCT 300  
20 CCACCACCTC CCGCCGATGG TGGCTACCA CCTCCTCCAG CTGATGGTGG ATCTCCTCCT 360  
GCCGATGGTG GCTCTCCACC TCCTCCGTCC GCTCACTAA 399

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENZKKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 132 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(iv) ANTISENSE: Nein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Artemisia vulgaris*

(D) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Pollen

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:6:

	Met	Ala	Lys	Cys	Ser	Tyr	Val	Phe	Cys	Ala	Val	Leu	Leu	Ile	Phe
	1				5					10					15
10	Ile	Leu	Ala	Ile	Gly	Glu	Ile	Glu	Ala	Ala	Gly	Ser	Lys	Leu	Cys
					20					25					30
	Glu	Lys	Thr	Ser	Lys	Thr	Tyr	Ser	Gly	Lys	Cys	Asp	Asn	Lys	Lys
					35					40					45
	Cys	Asp	Lys	Lys	Cys	Ile	Glu	Trp	Glu	Lys	Ala	Gln	His	Gly	Ala
15					50					55					60
	Cys	His	Lys	Arg	Glu	Ala	Gly	Lys	Glu	Ser	Cys	Phe	Cys	Tyr	Phe
					65					70					75
	Asp	Cys	Ser	Lys	Ser	Pro	Pro	Gly	Ala	Thr	Pro	Ala	Pro	Pro	Gly
					80					85					90
20	Ala	Ser	Pro	Pro	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ser	Pro	Pro	Pro	Pro	Ala
					95					100					105
	Asp	Gly	Gly	Ser	Pro	Pro	Pro	Pro	Ala	Asp	Gly	Gly	Ser	Pro	Pro
					110					115					120
	Ala	Asp	Gly	Gly	Ser	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	Ala	His			
25					125					130					

## LITERATUR:

1. Charpin, J., Surinyach, R., and Frankland, A.W. (1974) Atlas of European Allergenic pollens. Sandoz, Paris.
- 5 2. Spieksma, F.T.M., Charpin, H., Nolard, N., and Stix, E. (1980) Clin. Allergy 10: 319-329.
- 10 3. Cornillon, J., Bernard, J-P., Gueho, E., and Touraine, R. (1972) Rev. Franc. Allergol. 12: 131-135.
4. Domon, C., Evrard, J.L., Herdenberger, F., Pillay, D.T.N., and Steinmetz, A. (1990) Plant Mol. Biol. 15: 643-646.
- 15 5. Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G. (1997) Prot. Eng. 10: 1-6.
- 20 6. Matthiesen, F., Ipsen, H., and Løwenstein, H. (1991) In: Allergenic pollen and pollinosis in Europe. pp 36-44. D'Amato, G., Spieksma, F.T.M., and Bonini, S. eds., Blackwell Scientific Publications, Cambridge.

## PATENTANSPRÜCHE:

1. Rekombinante DNA-Moleküle, die für das Allergen Art v 1a codieren, welches die in SEQ ID NO:2 gezeigte Sequenz besitzt.

5 2. Rekombinante DNA-Moleküle nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß diese DNA-Moleküle die Nukleotidsequenz von SEQ ID NO:1 aufweisen

3. Rekombinante DNA-Moleküle nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß diese Moleküle eine Nukleotidsequenz aufweisen, die aus der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2 auf Grund der Degeneration des genetischen Codes abgeleitet wurde.

10 4. Rekombinante DNA-Moleküle nach Anspruch 1, die mehr als 60% Sequenzidentität mit SEQ ID NO:1 aufweisen.

5. Rekombinante DNA-Moleküle nach Anspruch 4, die für die Isoformen Art v 1b und Art v 1c codieren, dadurch gekennzeichnet, daß diese Isoformen die in SEQ ID NO:4 und 6 gezeigten Aminosäuresequenzen aufweisen

15 6. Rekombinante DNA-Moleküle nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß diese DNA-Moleküle die in SEQ ID NO:3 und 5 gezeigten Nukleotidsequenzen aufweisen.

7. Rekombinante DNA-Moleküle nach Anspruch 1 oder 5, die unter stringenten Bedingungen mit der in SEQ ID NO:1 gezeigten Sequenz hybridisieren und unter stringenten Waschbedingungen durch Hybridisierung gebunden bleiben.

20 8. Rekombinante DNA-Moleküle nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Isoformen Art v 1b und Art v 1c welche die in SEQ ID NO:3 und 5 gezeigten Nukleotidsequenzen aufweisen, unter stringenten Bedingungen mit der in SEQ ID NO:1 gezeigten Art v 1a Sequenz hybridisieren.

9. Eine Methode für die Produktion des Art v 1 Allergens die aus den folgenden  
25 Schritten besteht:

(a) Züchten prokaryotischer oder eukaryotischer Wirtszellen die eine für Art v 1 codierende DNA nach Anspruch 2, 4 oder 7 enthalten, so daß das Art v 1 Allergen durch die Wirtszellen exprimiert wird;

(b) Isolierung des Allergens Art v 1.

30 10. Eine Methode nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das rekombinante Allergen glycosiliert ist.



11. Verfahren zur Herstellung einer rekombinanten DNA nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß als stringente Hybridisierungsbedingungen 1 M NaCl in H<sub>2</sub>O bei 60°C. und als stringente Waschbedingungen 2 Mal für 30 min. waschen bei 50°C in 5x SSPE und  
5 0.1% SDS. 1x SSPE = 0.18M NaCl, 0.01M Natriumphosphat pH = 7.4, 1mM EDTA eingesetzt werden.

12. Ein replikationsfähiger prokaryotischer oder eukaryotischer Expressionsvektor, der DNA-Moleküle entsprechend den Ansprüchen 2, 4 oder 7 als Insert enthält.

13. Eine prokaryotische oder eukaryotische Wirtszelle, die einen Expressionsvektor  
10 nach Anspruch 11 enthält.

14. Eine Wirtszelle nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß diese Wirtszelle *Escherichia coli* ist.

15. Eine Wirtszelle nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß diese Wirtszelle *Pichia pastoris* ist.

16. Eine Wirtszelle nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß diese Wirtszelle  
15 pflanzlicher Natur ist.

17. Eine Wirtszelle nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß diese Wirtszelle eine Zellkultur von Tabak (*Nicotiana*) ist.

18. Ein pflanzlicher Wirtsorganismus, dadurch gekennzeichnet, daß dieser  
20 Wirtsorganismus eine Tabakpflanze (*Nicotiana*) ist.

19. Synthetische Oligosaccharide in freier oder an einen Träger gebundenen Form, deren Struktur dem Glykoanteil von Art v 1 entspricht.

20. Glykopeptide, die in ihrer Struktur dem natürlichen Molekül Art v 1 entsprechen.

21. Die Anwendung des rekombinanten Allergens Art v 1 nach Anspruch 9 für die  
25 Herstellung eines Mittels zur Diagnose und Therapie allergischer Patienten.

**Figur 1:** Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von Art v 1a. Die abgeleitete Aminosäuresequenz beginnt mit dem Startmethionin. Die durch Computeranalyse vorhergesagte N-terminale Signalsequenz ist kursiv gedruckt. Die durch Edman Abbau bestimmte N-terminale Aminosäuresequenz des natürlichen Allergens ist unterstrichen.

1	5	10	15	20
Met Ala Lys Cys Ser Tyr Val Phe Cys Ala Val Leu Leu Ile Phe Ile Val Ala Ile Gly				
ATG GCA AAG TGT TCA TAT GTT TTC TGT GCG GTT CTT CTG ATT TTC ATA GTT GCT ATC GGA				
1	9	18	27	36
				45
				54
	25	30	35	40
Glu Met Glu Ala Ala Gly Ser Lys Leu Cys Glu Lys Thr Ser Lys Thr Tyr Ser Gly Lys				
GAA ATG GAG GCC GCT GGT TCA AAG TTG TGT GAA AAG ACA AGC AAG ACG TAT TCG GGT AAG				
63	72	81	90	99
				108
				117
	45	50	55	60
Cys Asp Asn Lys Lys Cys Asp Lys Lys Cys Ile Glu Trp Glu Lys Ala Gln His Gly Ala				
TGC GAC AAC AAG AAA TGT GAC AAA AAG TGT ATA GAG TGG GAG AAA GCG CAA CAT GCT GCT				
126	135	144	153	162
				171
				180
	65	70	75	80
Cys His Lys Arg Glu Ala Gly Lys Glu Ser Cys Phe Cys Tyr Phe Asp Cys Ser Lys Ser				
TGT CAC AAG AGA GAA GCC GGC AAA GAA AGT TGC TTT TGC TAC TTT GAC TGT TCC AAA TCG				
189	198	207	216	225
				234
	85	90	95	100
Pro Pro Gly Ala Thr Pro Ala Pro Pro Gly Ala Ala Pro Pro Pro Ala Ala Gly Gly Ser				
CCT CCT GGA GCA ACA CCA GCG CCT CCT GGT GCA GCT CCT CCC CCA GCT GCT GGC GGC TCT				
243	252	261	270	279
				288
				297
	105	110	115	120
Pro Ser Pro Pro Ala Asp Gly Gly Ser Pro Pro Pro Pro Ala Asp Gly Gly Ser Pro Pro				
CCG TCA CCT CCC GCT GAT GGT GGC TCA CCA CCT CCT CCA GCT GAT GGT GGA TCT CCT CCT				
306	315	324	333	342
				351
				360
	125	130		
Val Asp Gly Gly Ser Pro Pro Pro Pro Ser Thr His *				
GTA GAT GGT GGC TCT CCA CCT CCT CCG TCC ACT CAC TAA				
369	378	387	396	

**Figur 2:** Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von Art v 1b. Die abgeleitete Aminosäuresequenz beginnt mit dem Startmethionin. Die durch Computeranalyse vorhergesagte N-terminale Signalsequenz ist kursiv gedruckt. Die durch Edman Abbau bestimmte N-terminale Aminosäuresequenz des natürlichen Allergens ist unterstrichen.

1				5						10					15					20
Met	Ala	Arg	Cys	Ser	Tyr	Val	Phe	Cys	Ala	Val	Leu	Leu	Ile	Phe	Val	Leu	Ala	Ile	Gly	
ATG	GCG	AGG	TGT	TCA	TAT	GTT	TTC	TGC	GCG	GTT	CTT	CTG	ATT	TTC	GTA	CTT	GCT	ATC	GGA	
		9				18			27			36		45			54			
				25						30				35					40	
Glu	Ile	Glu	Ala	Ala	Gly	Ser	Lys	Leu	Cys	Glu	Lys	Thr	Ser	Lys	Thr	Tyr	Ser	Gly	Lys	
GAA	ATT	GAG	GCC	GCT	GGT	TCA	AAG	CTG	TGT	GAA	AAG	ACA	AGC	AAG	ACG	TAT	TCG	GGT	AAG	
63			72			81			90			99		108			117			
				45						50				55					60	
Cys	Asp	Asn	Lys	Lys	Cys	Asp	Lys	Lys	Cys	Ile	Glu	Trp	Glu	Lys	Ala	Gln	His	Gly	Ala	
TGC	GAC	AAC	AAG	AAA	TGT	GAC	AAA	AAG	TGT	ATA	GAA	TGG	GAG	AAA	GCA	CAA	CAT	GGT	GCT	
126				135			144			153			162			171			180	
				65						70				75					80	
Cys	His	Lys	Arg	Glu	Ala	Gly	Lys	Glu	Ser	Cys	Phe	Cys	Tyr	Phe	Asp	Cys	Ser	Lys	Ser	
TGT	CAC	AAG	AGA	GAA	GCC	GGT	AAA	GAA	AGT	TGC	TTT	TGC	TAC	TTT	GAC	TGT	TCC	AAA	TCG	
		189				198			207			216		225			234			
				85						90				95					100	
Pro	Pro	Gly	Ala	Thr	Pro	Ala	Pro	Pro	Gly	Ala	Ser	Pro	Pro	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ser	
CCT	CCT	GGA	GCG	ACA	CCA	GCG	CCT	CCT	GGA	GCA	TCT	CCT	CCC	CCA	GCT	GCT	GGC	GGC	TCT	
243			252			261			270			279			288			297		
				105						110				115					120	
Pro	Pro	Pro	Pro	Ala	Asp	Gly	Gly	Ser	Pro	Pro	Pro	Pro	Ala	Asp	Gly	Gly	Ser	Pro	Pro	
CCA	CCA	CCT	CCC	GCC	GAT	GGT	GGC	TCA	CCA	CCT	CCT	CCA	GCT	GAT	GGT	GGA	TCT	CCT	CCT	
306				315			324			333			342			351			360	
				125						130										
Ala	Asp	Gly	Gly	Ser	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	Ala	His	*								
GCC	GAT	GGT	GGC	TCT	CCA	CCT	CCT	CCG	TCC	GCT	CAC	TAA								
369				378				387			396									

**Figur 3:** Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von Art v 1c. Die abgeleitete Aminosäuresequenz beginnt mit dem Startmethionin. Die durch Computeranalyse vorhergesagte N-terminale Signalsequenz ist kursiv gedruckt. Die durch Edman Abbau bestimmte N-terminale Aminosäuresequenz des natürlichen Allergens ist unterstrichen.

1	5	10	15	20															
Met	Ala	Lys	Cys	Ser	Tyr	Val	Phe	Cys	Ala	Val	Leu	Leu	Ile	Phe	Ile	Leu	Ala	Ile	Gly
ATG	GCA	AAG	TGT	TCA	TAT	GTT	TTC	TGT	GCG	GTT	CTT	CTG	ATT	TTC	ATA	CTT	GCT	ATC	GGA
	9				18			27			36			45			54		
				25				30						35					40
Glu	Ile	Glu	Ala	Ala	Gly	Ser	Lys	Leu	Cys	Glu	Lys	Thr	Ser	Lys	Thr	Tyr	Ser	Gly	Lys
GAA	ATA	GAG	GCC	GCT	GGT	TCA	AAG	CTG	TGT	GAA	AAG	ACA	AGC	AAG	ACG	TAT	TCA	GGT	AAG
63			72			81			90			99			108			117	
				45				50						55					60
Cys	Asp	Asn	Lys	Lys	Cys	Asp	Lys	Lys	Cys	Ile	Glu	Trp	Glu	Lys	Ala	Gln	His	Gly	Ala
TGC	GAC	AAC	AAG	AAA	TGT	GAC	AAA	AAG	TGT	ATA	GAA	TGG	GAG	AAA	GCA	CAA	CAT	GGT	GCT
126				135			144			153			162			171			180
				65				70						75					80
Cys	His	Lys	Arg	Glu	Ala	Gly	Lys	Glu	Ser	Cys	Phe	Cys	Tyr	Phe	Asp	Cys	Ser	Lys	Ser
TGT	CAC	AAG	AGA	GAA	GCC	GGT	AAA	GAA	AGT	TGC	TTT	TGC	TAC	TTT	GAC	TGT	TCC	AAA	TCG
	189				198			207			216			225			234		
				85				90						95					100
Pro	Pro	Gly	Ala	Thr	Pro	Ala	Pro	Pro	Gly	Ala	Ser	Pro	Pro	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ser
CCT	CCT	GGA	GCG	ACA	CCA	GCG	CCT	CCT	GGA	GCA	TCT	CCT	CCC	CCA	GCT	GCT	GGC	GGC	TCT
243			252			261			270			279			288			297	
				105				110						115					120
Pro	Pro	Pro	Pro	Ala	Asp	Gly	Gly	Ser	Pro	Pro	Pro	Pro	Ala	Asp	Gly	Gly	Ser	Pro	Pro
CCA	CCA	CCT	CCC	GCC	GAT	GGT	GGC	TCA	CCA	CCT	CCT	CCA	GCT	GAT	GGT	GGA	TCT	CCT	CCT
306				315			324			333			342			351			360
				125				130											
Ala	Asp	Gly	Gly	Ser	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	Ala	His	*							
GCC	GAT	GGT	GGC	TCT	CCA	CCT	CCT	CCG	TCC	GCT	CAC	TAA							
	369				378			387			396								

**Figur 4:** Vergleich der Nukleotidsequenz des offenen Leserahmens von Art v 1a, Art v 1b und Art v 1c. Die Nukleotide, die nicht in allen drei Sequenzen identisch sind, sind im Text hervorgehoben.

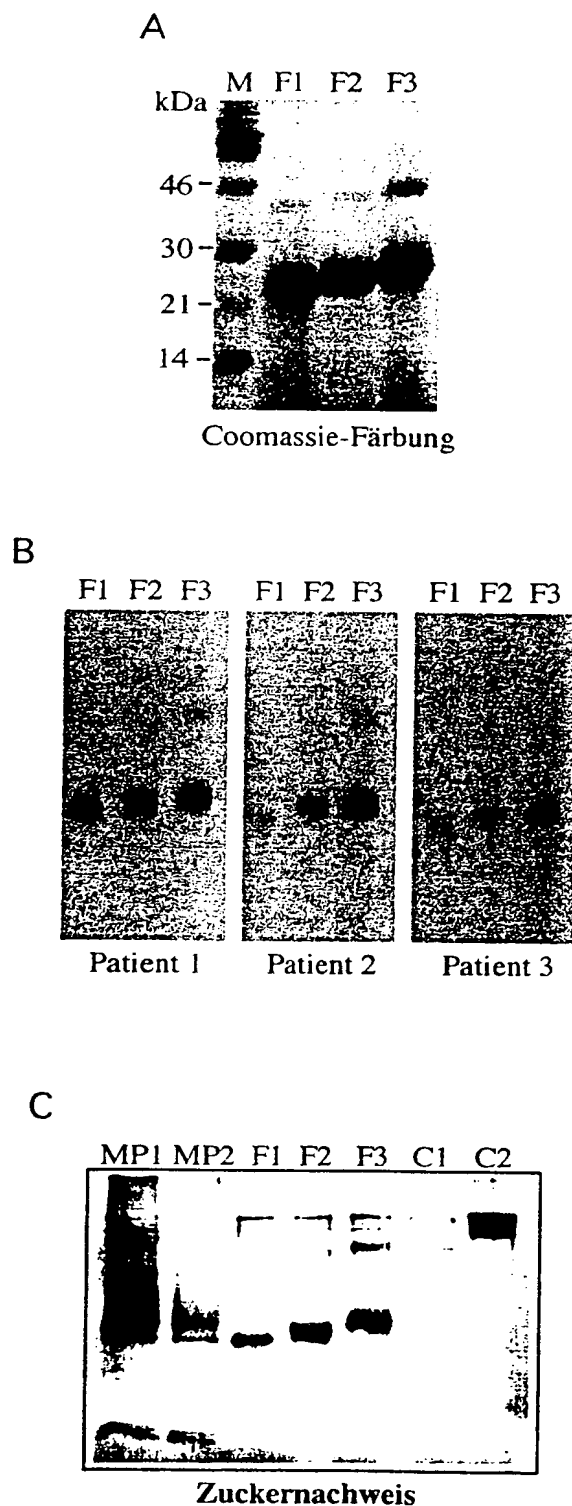
	A T G G C A A A G T G T T C A T A T G T T T T C T G T G C G G T T C T T C T G A	Consensus
	10 20 30 40	
1	A T G G C A A A G T G T T C A T A T G T T T T C T G T G C G G T T C T T C T G A	Art v 1a
1	A T G G C <b>G</b> A <b>G</b> T G T T C A T A T G T T T T C T G <b>C</b> G C G G T T C T T C T G A	Art v 1b
1	A T G G C A A A G T G T T C A T A T G T T T T C T G T G C G G T T C T T C T G A	Art v 1c
	T T T T C A T A C T T G C T A T C G G A G A A A T X G A G G C C G C T G G T T C	Consensus
	50 60 70 80	
41	T T T T C A T A <b>G</b> T T G C T A T C G G A G A A A T <b>G</b> G A G G C C G C T G G T T C	Art v 1a
41	T T T T C <b>G</b> T A C T T G C T A T C G G A G A A A T T G A G G C C G C T G G T T C	Art v 1b
41	T T T T C A T A C T T G C T A T C G G A G A A A T <b>A</b> G A G G C C G C T G G T T C	Art v 1c
	A A A G C T G T G T G A A A A G A C A A G C A A G A C G T A T T C G G G T A A G	Consensus
	90 100 110 120	
81	A A A G <b>T</b> T G T G T G A A A A G A C A A G C A A G A C G T A T T C G G G T A A G	Art v 1a
81	A A A G C T G T G T G A A A A G A C A A G C A A G A C G T A T T C <b>G</b> G G T A A G	Art v 1b
81	A A A G C T G T G T G A A A A G A C A A G C A A G A C G T A T T C <b>A</b> G G T A A G	Art v 1c
	T G C G A C A A C A A G A A A T G T G A C A A A A A G T G T A T A G A A T G G G	Consensus
	130 140 150 160	
121	T G C G A C A A C A A G A A A T G T G A C A A A A A G T G T A T A G A <b>G</b> T G G G	Art v 1a
121	T G C G A C A A C A A G A A A T G T G A C A A A A A G T G T A T A G A A T G G G	Art v 1b
121	T G C G A C A A C A A G A A A T G T G A C A A A A A G T G T A T A G A A T G G G	Art v 1c
	A G A A A G C A C A A C A T G G T G C T T G T C A C A A G A G A G A A G C C G G	Consensus
	170 180 190 200	
161	A G A A A G C <b>G</b> C A A C A T G G T G C T T G T C A C A A G A G A G A A G C C G G	Art v 1a
161	A G A A A G C A C A A C A T G G T G C T T G T C A C A A G A G A G A A G C C G G	Art v 1b
161	A G A A A G C A C A A C A T G G T G C T T G T C A C A A G A G A G A A G C C G G	Art v 1c
	T A A A G A A A G T T G C T T T T G C T A C T T T G A C T G T T C C A A A T C G	Consensus
	210 220 230 240	
201	<b>C</b> A A A G A A A G T T G C T T T T G C T A C T T T G A C T G T T C C A A A T C G	Art v 1a
201	T A A A G A A A G T T G C T T T T G C T A C T T T G A C T G T T C C A A A T C G	Art v 1b
201	T A A A G A A A G T T G C T T T T G C T A C T T T G A C T G T T C C A A A T C G	Art v 1c
	C C T C C T G G A G C G A C A C C A G C G C C T C C T G G A G C A T C T C C T C	Consensus
	250 260 270 280	
241	C C T C C T G G A G C <b>A</b> A C A C C A G C G C C T C C T G G <b>T</b> G C A <b>G</b> C T C C T C	Art v 1a
241	C C T C C T G G A G C G A C A C C A G C G C C T C C T G G A G C A T C T C C T C	Art v 1b
241	C C T C C T G G A G C G A C A C C A G C G C C T C C T G G A G C A T C T C C T C	Art v 1c
	C C C C A G C T G C T G G C G G C T C T C C A C C A C C T C C C G C C G A T G G	Consensus
	290 300 310 320	
281	C C C C A G C T G C T G G C G G C T C T C C <b>G</b> T C A C C T C C C G C <b>T</b> G A T G G	Art v 1a
281	C C C C A G C T G C T G G C G G C T C T C C A C C A C C T C C C G C C G A T G G	Art v 1b
281	C C C C A G C T G C T G G C G G C T C T C C A C C A C C T C C C G C C G A T G G	Art v 1c

**Cont. Figur 4**

T G G C T C A C C A C C T C C T C C A G C T G A T G G T G G A T C T C C T C C T Consensus  
 330 340 350 360  
 321 T G G C T C A C C A C C T C C T C C A G C T G A T G G T G G A T C T C C T C C T Art v 1  
 321 T G G C T C A C C A C C T C C T C C A G C T G A T G G T G G A T C T C C T C C T Art v 1  
 321 T G G C T C A C C A C C T C C T C C A G C T G A T G G T G G A T C T C C T C C T Art v 1  
 G C C G A T G G T G G C T C T C C A C C T C C T C C G T C C G C T C A C T A A Consensus  
 370 380 390  
 361 G T A G A T G G T G G C T C T C C A C C T C C T C C G T C C A C T C A C T A A Art v 1a  
 361 G C C G A T G G T G G C T C T C C A C C T C C T C C G T C C G C T C A C T A A Art v 1b  
 361 G C C G A T G G T G G C T C T C C A C C T C C T C C G T C C G C T C A C T A A Art v 1c

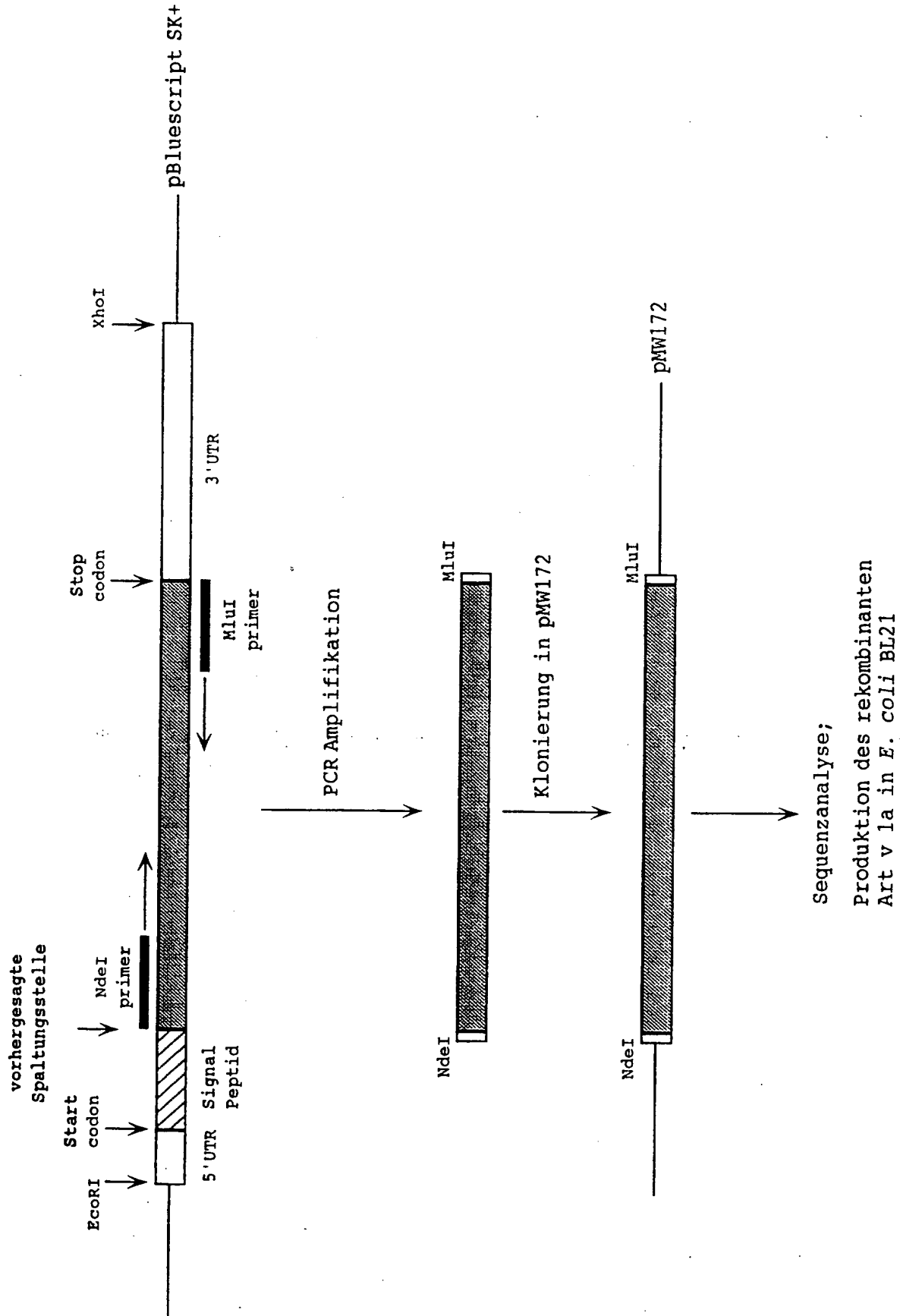
**Figur 5:** Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von Art v 1a, Art v 1b und Art v 1c. Die Aminosäuren, die nicht in allen drei Sequenzen identisch sind, sind im Text hervorgehoben.

	MAKCSYVFC	AVLLIFILA	IGEIEAAGSKLC	Consensus
	10	20	30	
1	MAKCSYVFC	AVLLIFIV	AEIGEAEAGSKLC	Art v 1a
1	MA <sup>R</sup> CSYVFC	AVLLIFV	LAIGEIEAAGSKLC	Art v 1b
1	MAKCSYVFC	AVLLIFILA	IGEIEAAGSKLC	Art v 1c
	EKTSKTYSGK	CDNKKCDK	KCIEWEKAQHGA	Consensus
	40	50	60	
31	EKTSKTYSGK	CDNKKCDK	KCIEWEKAQHGA	Art v 1a
31	EKTSKTYSGK	CDNKKCDK	KCIEWEKAQHGA	Art v 1b
31	EKTSKTYSGK	CDNKKCDK	KCIEWEKAQHGA	Art v 1c
	CHKREAGKES	CFCYFDCSK	SPPGATPAPPG	Consensus
	70	80	90	
61	CHKREAGKES	CFCYFDCSK	SPPGATPAPPG	Art v 1a
61	CHKREAGKES	CFCYFDCSK	SPPGATPAPPG	Art v 1b
61	CHKREAGKES	CFCYFDCSK	SPPGATPAPPG	Art v 1c
	ASPPPAAGGS	PPPPADGG	SPPPPADGGSP	Consensus
	100	110	120	
91	A <sup>A</sup> PPPPAAGGS	P <sup>S</sup> PPPADGG	SPPPPADGGSP	Art v 1a
91	ASPPPAAGGS	PPPPADGG	SPPPPADGGSP	Art v 1b
91	ASPPPAAGGS	PPPPADGG	SPPPPADGGSP	Art v 1c
	ADGGSPPPPS	AH	Consensus	
	130			
121	V <sup>D</sup> GGSPPPPS	T <sup>H</sup>	Art v 1a	
121	ADGGSPPPPS	AH	Art v 1b	
121	ADGGSPPPPS	AH	Art v 1c	

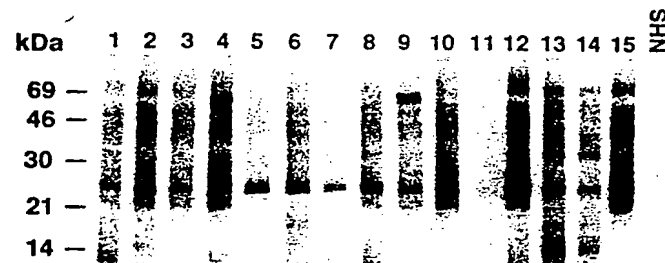
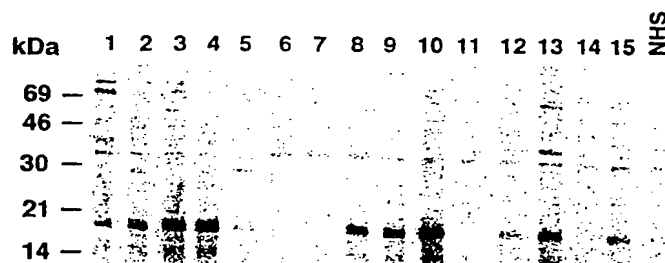
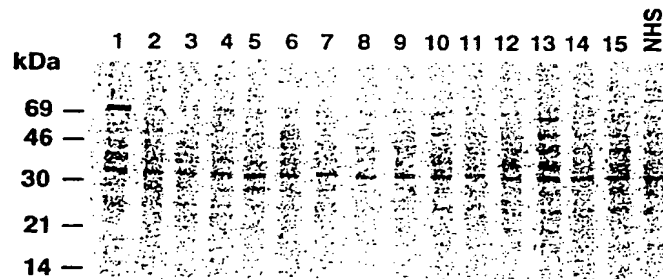


**Figur 6:** Charakterisierung des gereinigten natürlichen Allergens Art v 1. Teil A: Coomassie Brilliant Blue Färbung von drei Fraktionen, die Art v 1 enthalten (F1, F2 und F3). Diese Fraktionen wurden auch auf ihre IgE Bindungseigenschaften mit Seren von Beifußpollen-allergischen Patienten getestet (Teil B). Teil C: DIG Glycan/Protein Färbung von Beifußpollenextrakten (Spur MP1 und MP2), und von gereinigten Art v 1 Fraktionen (Spur F1, F2 und F3). C1: Negativkontrolle (rekombinante Kreatinase); C2: Positivkontrolle (Fetuin).



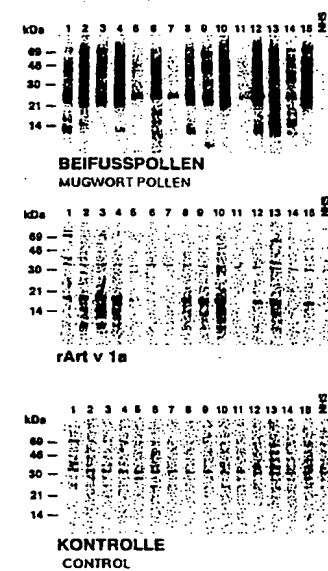


**Figur 7:** Konstruktion des Expressionsplasmides für Art v 1a. Der Teil der cDNA von Art v 1 der der reifen Form des Proteins entspricht wurde in E. coli als Nichtfusionsprotein exprimiert.

**BEIFUSSPOLLEN****rArt v 1a****KONTROLLE**

**Figur 8:** IgE Immunblot von rekombinanten Art v 1a (rArt v 1a). Seren von 15 Beifußpollen-allergischen Patienten (1-15) wurden auf ihre IgE-Bindungseigenschaften mit Beifußpollenextrakt und mit rArt v 1a getestet, welches in *E. coli* BL21 exprimiert worden war. Als Kontrolle wurde bakterielles Lysat von *E. coli* verwendet, welches den Expressionsvektor pMW172 ohne Insert enthielt. NHS: Normales Humanserum.

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12N 15/29, A01H 5/00, C07H 3/06, C07K 14/415, A61K 39/36</b>		<b>A3</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/49045</b>
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	30. September 1999 (30.09.99)
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT99/00081</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 25. März 1999 (25.03.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: A 539/98 26. März 1998 (26.03.98) AT</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOMAY PRODUKTIONS- UND HANDELSGESELLSCHAFT MBH [AT/AT]; Herrenstrasse 2, A-4020 Linz (AT).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FERREIRA, Fatima [BR/AT]; Würzenberg 35, A-5102 Anthering (AT). RICHTER, Klaus [AT/AT]; Auwaldstrasse 218, A-5081 Anif (AT). ENGEL, Edwin [AT/AT]; Karl im Hof Weg 6, A-8773 Kammern (AT). EBNER, Christof [AT/AT]; Heinrich-Albrechtgasse 19/1, A-2345 Brunn am Gebirge (AT). KRAFT, Dietrich [AT/AT]; Montigasse 1, A-1170 Wien (AT). BREITENBACH, Michael [AT/AT]; Leder- waschgasse 22/4, A-5020 Salzburg (AT). HIMLY, Martin [AT/AT]; Anzengruberstrasse 7, A-9500 Villach (AT).</p> <p>(74) Anwälte: CASATI, Wilhelm usw.; Amerlingstrasse 8, A-1061 Wien (AT).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</p> <p>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenbe- richts: 10. Februar 2000 (10.02.00)</p>	
(54) Title: RECOMBINANT MAJOR ALLERGEN OF THE POLLEN OF ARTEMISIA VULGARIS (MUGWORT)			
(54) Bezeichnung: REKOMBINANTES HAUPTALLERGEN DES POLLENS VON ARTEMISIA VULGARIS (BEIFUSS)			
(57) Abstract			
<p>The invention relates to DNA molecules which code for the allergen Art v 1 or isoforms thereof, the sequence of the allergen, a method for the production of an Art v 1 molecule, a vector and a transformed host cell.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Gezeigt werden rekombinante DNA-Moleküle, die für das Allergen Art v 1 bzw. die zugehörigen Isoformen codieren, die Sequenz des Allergens, ein Verfahren zur Herstellung eines Art v 1 Moleküles, sowie ein Vektor und eine transformierte Wirtszelle.</p>			
 <p>IgE Immunoblot von rekombinanten Art v 1a (rArt v 1a). Seren von 15 Beifußpollen-allergischen Patienten (1-15) wurden auf ihre IgE-Bindungseigenschaften mit Beifußpollenextrakt und mit rArt v 1a getestet, welches in E. coli BL21 exprimiert worden war. Als Kontrolle wurde bakterielles Lysat von E. coli verwendet, welches den Expressionsvektor pMW172 ohne Insert enthielt. NHS: Normales Humanserum.</p> <p>IgE RECOMBINANT-TYPE IMMUNE BLOT v 1a (rArt v 1a). SERINES FROM 15 PATIENTS (1-15) ALLERGIC TO MUGWORT POLLEN WERE TESTED FOR THEIR IgE BONDING PROPERTIES WITH MUGWORT POLLEN EXTRACT AND rArt v 1a WHICH WAS EXPRESSED IN E. coli BL21. E. coli BACTERIAL LYSATE WAS USED AS A CONTROL, CONTAINING THE pMW172 EXPRESSION VECTOR WITHOUT AN INSERT. NHS: NORMAL HUMAN SERUM.</p>			

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Amenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/AT 99/00081

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/29 A01H5/00 C07H3/06 C07K14/415 A61K39/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97 05258 A (BIOMAY PROD & HANDEL ;FERREIRA FATIMA (AT); RICHTER KLAUS (AT); EN) 13 February 1997 (1997-02-13) figure 13	1-21
A	----- HIRSCHWEHR R ET AL.: "Identification of common allergenic structures in mugwort and ragweed pollen" THE JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 101, no. 2 Pt1, February 1998 (1998-02), pages 196-206, XP000857295 page 200 -----	1-21

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 November 1999

Date of mailing of the international search report

10/12/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cupido, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AT 99/00081

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: 19  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
See ADDITIONAL MATTER, Supplemental Sheet PCT/ISA/210
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of box I.2

Claim No. 19

Claim 19 relates to a synthetic oligosaccharide characterised by a desirable quality, i.e. the structure thereof corresponds to the proportion of glyco of species V1. In the present case, Claim 19 lacks the corresponding support or the application so lacks disclosure that a meaningful search is impossible. Independent of the above reasoning, the claim also lacks clarity as required in Article 6 PCT. An attempt is made to define the product by the result that is to be achieved. Again, this lack of clarity is such as to render a meaningful search impossible.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure whereby the applicant provides new claims.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International Application No

PCT/AT 99/00081

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9705258 A	13-02-1997	AT 402505 B	25-06-1997
		AT 132095 A	15-10-1996
		AU 6605996 A	26-02-1997
<hr/>			



# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 99/00081

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/29 A01H5/00 C07H3/06 C07K14/415 A61K39/36

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 97 05258 A (BIOMAY PROD & HANDEL ;FERREIRA FATIMA (AT); RICHTER KLAUS (AT); EN) 13. Februar 1997 (1997-02-13) Abbildung 13	1-21
A	HIRSCHWEHR R ET AL.: "Identification of common allergenic structures in mugwort and ragweed pollen" THE JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, Bd. 101, Nr. 2 Pt1, Februar 1998 (1998-02), Seiten 196-206, XP000857295 Seite 200	1-21

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

26. November 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

10/12/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Cupido, M

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 99/00081

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
  
2. ☒ Ansprüche Nr. 19  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
Siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
  
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
  
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
  
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
  
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 19

Die geltenden Patentanspruch 19 bezieht sich auf ein synthetische oligosaccharide, charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenschaft, nämlich dass deren Struktur dem Glykoanteil von Art v 1 entspricht. Im vorliegenden Fall fehlt der Patentanspruch 19 die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Produkt über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche unmöglich macht.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.

# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 99/00081

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9705258 A	13-02-1997	AT 402505 B	25-06-1997
		AT 132095 A	15-10-1996
		AU 6605996 A	26-02-1997
<hr/>			